

## 細菌のコールドショック-コールドショックからの回復機構-

著者	佐藤 幹夫
号	61
発行年	1969
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/12442">http://hdl.handle.net/10097/12442</a>

氏 名 (本籍) さ とう みき お  
佐 藤 幹 夫 (宮城県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 6 1 号

学位授与年月日 昭和 4 4 年 6 月 1 2 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院農学研究科  
(博士課程) 農芸化学専攻

学 位 論 文 題 目 細菌のコールドショック  
ーコールドショックからの回復機構ー

(主 査)  
論文審査委員 教授 高 橋 甫 教授 古 坂 澄 石  
教授 志 村 憲 助

# 論文内容要旨

## 第一章 緒 言

1923年ShermanとAlbusは対数期の大腸菌を急速に冷却すると、その大部分が集落形成能を失なって死滅することを発見した。この現象はコールドショックとよばれ、大腸菌特有の現象ではなく、他のグラム陰性菌についても報告された。コールドショックによる死滅は対数期の細菌について観察され、定常期の細菌は影響を受けない。その原因及び機構を解明しようとする努力が多くの人達により払われ、その内容が遂次明らかにされつつある。

Meynell(1958年)は大腸菌を高濃度のシロ糖液にコールドショックすると菌は保護されること、及びT2フェージを感染させた大腸菌をコールドショックすると、音波処理と同様に細胞の破壊が起ることを観察し、コールドショックによる死滅効果は透過性の調節機構の変化に関係するものと考えた。その後、*Aerobacter aerogenes*をコールドショックすると、菌体外にATPやアミノ酸等の漏出が起ることがStrangeら(1962年)により観察され、Meynellの仮説は支持された。更に、色素やRNaseがコールドショックを受けた細胞内に、対照に比較して容易に侵入することが明らかにされ、透過性の変化が確認された。以上により、コールドショックにより透過性が増大することから細胞膜系の障害が起ることは確実となったが、これが一次的な致死の原因とどのように結びつくかは決定的ではなかった。

コールドショックを行なう低温の緩衝液中に前もって二価の金属イオン、特にマグネシウムイオンが存在すると、細胞はコールドショックから保護され、集落形成能を保持できることが*A. aerogenes*について明らかにされたが、このイオンの作用機作についても不明であった。

近年、Smeatonら(1967年)は*Bacillus subtilis*を注射器にとり、低温の緩衝液に注入するという新しい方法を用いてコールドショックを行なうと、RNase-inhibitorが菌体外に放出されることを観察し、その際RNase-inhibitorの遊離はある一定の温度間(14°~16℃)の急速な通過により起ることを示した。このような温度間はそれまで明らかにされなかったものである。

以上のように、コールドショックによる死滅について未解決の問題が多く含まれていることは明らかである。

本論文はコールドショックにより細菌が死に到る過程を解明することを最終目的とし、主に大腸菌を用いて、Smeatonらの方法によりコールドショックを行ない、コールドショックからの回復機構の一端を明らかにしたものである。

## 第二章 コールドショックの条件

対数期の細菌のみがコールドショックに対して感受性であることが知られている。Smeatonら

の方法でコールドショックを行なうとき、増殖時期で生残率に差異が認められるか否か平板法により検討した結果、対数期の中期から後期にかけての菌はコールドショックにより大部分が死滅するが、定常期の菌は影響を受けないことを認めた(図1)。

### 第三章 コールドショックにおける温度関

SmeatonらはコールドショックによるRNase-inhibitorの放出量を温度の面から検討して温度閾を観察した。本章では集落形成能について同様な実験を試みた結果Smeatonらの発見とは異なり、死滅には二つの温度閾が存在し、しかもその温度閾は最初の菌懸濁液の温度に関係があり一定の閾値でないことを明らかにした(図2)。同様の現象は大腸菌以外に*Pseudomonas fluorescens*, *B. subtilis*, また発芽した*B. subtilis*の胞子についても観察されることから、その一般性が認められる。

### 第四章 コールドショックによる死滅に及ぼす金属イオンの影響

二価の金属イオン、特にマグネシウムイオンの存在が細胞をコールドショックから保護するのに最も効果的であることが、*A. aerogenes*についてすでに明らかにされたが、本章では大腸菌等を用いて、金属イオンの影響を調べた。大腸菌では二価のイオン、特にマグネシウムイオンに強い保護作用があり、細胞の大部分は死滅しない。同様の現象は、*B. subtilis*, *Ps. fluorescens*や発芽した*B. subtilis*の胞子についても観察されることから、その一般性が認められる。酢酸マグネシウム及び硫酸マグネシウムのいずれの場合でも同様な効果が示されることから、二価の金属イオンに保護作用があると考えられる。その最適濃度は $5 \sim 25 \times 10^{-3} \text{M}$ 附近である。(図3)。一価の金属イオンでは保護効果はみられない。

### 第五章 コールドショックからの回復現象

コールドショックによる細菌の死滅機構を調べる場合、回復条件が明らかにされれば、問題の解決を容易にすると考えられる。二価の金属イオンの保護効果が明らかにされたので、コールドショック後、二価の金属イオンを添加した場合、生残率の増加が起るかどうかが調べた結果、コールドショックして2分後にマグネシウムイオン( $10^{-1} \text{M}$ )を添加し、更に2分間3℃でインキュベートした後、希釈し生菌数を測定すると、コールドショックを行なわない対照とほぼ同じ程度にまで生残率が増加した。コールドショック後、3℃におき、60分後にマグネシウムイオンを添加すると、部分的な回復が見られるが、2時間後に添加しても全く回復はみられない。このことから細菌はコールドショックを受けると、マグネシウムイオン添加により回復可能な段階から不能な段階へ時間

の経過と共に移行するものと考えられる。

## 第六章 コールドショックからの回復機構の検索

前章でコールドショックからの回復がマグネシウムイオンの添加により起ることが明らかとなった。本章ではこの回復条件を詳細に検討した。コールドショック後、生理的濃度のマグネシウムイオン ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) を添加し、 $30^\circ\text{C}$  に加温すると、短時間 (10 分前後) に生残率が増加することを認めた (図 4)。従って、前章で観察された高濃度のマグネシウムイオンによる回復は、生菌数測定のため希釈する際、適当な濃度となったマグネシウムイオンを含む希釈液中で起るものと考えられる。前章で、コールドショックを行なった細胞はマグネシウムイオン添加により回復可能な段階から不能な段階へ時間と共に移行することが示されたが、生理的濃度のマグネシウムイオンによる回復についても同様の結果が得られた。

コールドショック後マグネシウムイオンと共に 2, 4-ジニトロフェノール (DNP) を添加すると、回復が著しく阻害される。しかし、更に NAD 或は ATP とニコチンアミドを添加すると、DNP による阻害がのぞかれる (図 5 (イ) と (ロ))。マグネシウムイオンによる回復を低温でインキュベートすることにより抑えると、NAD の添加効果が認められる (図 6)。これらの結果より、NAD は恐らくエネルギー源として回復過程に要求されるものと考えられる。大腸菌は一般に ATP や NAD を細胞内に透過できないとされている。本実験条件下で透過性に変化が起るか否かを、蛋白と結合すると蛍光を発する色素である 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸塩を用いて調べた結果、コールドショックを受けた細胞の透過性の増加が認められた。恐らく、NAD や ATP はこの透過性の増加によって細胞内に入ることが出来るものと考えられる。生体内には電子受容体として NAD を要求する多くの脱水素酵素が存在するが、NAD をエネルギー源として要求する酵素は現在まで、二、三知られているにすぎない。これらの中で、二本鎖の DNA 中の一本鎖に生じた切れ目 (nick) を連結を触媒する DNA リガーゼは、マグネシウムイオンと共にエネルギー源として NAD をその反応に要求する。従ってコールドショックからの回復反応とその要求性が類似している。これに関係した実験結果は第八章及び第九章でのべる。

## 第七章 胞子の発芽とコールドショック

コールドショックによる死滅は対数期の栄養細胞に特有の現象であるか否か検討するため、発芽した *B. subtilis* の胞子について実験を試みた。その結果、コールドショックにより発芽胞子の大部分が死滅すること、マグネシウムイオンで最も保護効果があること、マグネシウムイオンを含む適当な添加物を加えると回復すること、及びコールドショックには二つの温度閾が存在するこ

などが明らかとなった。特にほぼ同調的に発芽した胞子についても二つの温度間が存在することから、二つの温度間是对数期の細胞集団の非同調性に由来するという可能性は否定的である。

## 第八章 コールドショックとDNA

本章及び次章はコールドショックからの回復過程にDNAリガーゼ反応が関係する可能性を検討したものである。本章ではコールドショックを受けた細胞のDNAと対照DNA間で、その分解速度に差異が認められるか否か調べた。DNA上にnickが多ければ、菌体内ヌクレアーゼによるDNAの分解はより速やかに進行するであろう。

$^3\text{H}$ -チミンで標識した細胞のリゾチーム溶菌液を透析膜に入れ、外液へ漏出する放射能の経時的測定から、溶菌液中のヌクレアーゼによるDNAの分解を調べた結果、コールドショックを与えた細胞より調製した溶菌液試料からの放射能の漏出速度は、コールドショックを行なわない対照に比較して速いが、マグネシウムイオンにより回復させた細胞からの試料では、その速度は対照とほぼ同じである(図7)。一本鎖に切れ目の入った二本鎖DNAはエキソヌクレアーゼ型のDNaseに対し、切れ目のない二本鎖DNAに比べ作用を受けやすいと考えられることを考慮すると、コールドショックした細胞ではDNAに切れ目が多く存在するという推定を一応支持する結果である。第五章で、コールドショックを受けた細胞はマグネシウムイオンにより回復できる段階から回復不能の段階に時間の経過と共に移行することが示された。そこで、コールドショック後、2.5分、60分、及び120分でマグネシウムイオンを添加し、インキュベートした後、試料を調製し、同様な方法で透析膜外へ漏出する放射能を調べた結果、マグネシウムイオンによる集落形成能の回復効果が低下するほどDNAの低分子化が速やかになることが明らかにされた(図8)。これは低温でインキュベートする時間の増加と共に、ある種のDNaseが誘発されて、DNAはマグネシウムイオンを添加しても回復し得ない状態に変化するためであろう。

## 第九章 回復過程とDNAリガーゼ反応

第六章でコールドショックからの回復過程にDNAリガーゼ反応が関与する可能性が論議され、前章でこれを支持する結果が得られた。しかしいずれも間接的な証拠であった。本章はニトロセルローズ吸着法を用いて、より直接的に、DNAリガーゼ反応のコールドショックからの回復への関与を証明したものである。

島田ら(1968年)はニトロセルローズ製のメンブランフィルターが一本鎖DNAを特異的に吸着する性質を利用して、DNAの切断の検出法を確立した。彼等の方法は、 $^{14}\text{C}$ -チミンで標識した大腸菌DNAを用い、高塩濃度溶液に溶解し、 $100^\circ\text{C}$ で10分間加熱後急冷する。この操作で比較的小さ

な DNA 分子は変性して一本鎖になるが、大きな DNA は二本鎖のままとどまる。そこで一本鎖区分のみをメンブランフィルターに吸着させ、その量を放射能により測定すれば、DNA 分子上の切れ目——短い DNA の量——を定量できる。本実験では、島田等の方法を応用し、細胞より温和な条件で DNA 試料を調製し、高塩濃度下で熱変性させ、ニトロセルローズに一本鎖 DNA を吸着させ、コールドショックと DNA の熱変性の受けやすさに関係があるか否か調べた。結果を表 1 に示す。コールドショックを行わない細胞より調製した試料を熱変性すると、18% がニトロセルローズに吸着されるが、コールドショックを行なった細胞に由来する試料では吸着量が 40% に増加する。しかし、マグネシウムイオンを添加して回復させると、その値は 30% に低下し、更に、マグネシウムイオンと NAD を加えて回復させた場合には、その値が 23% に低下してほぼコールドショックを与えない対照の値にまで吸着量が減少する。一方、NAD のみ添加の場合には 40% と吸着量の低下は認められない。温和な条件で DNA 試料を調製していること、及び DNA の二本鎖の切断を修復する反応は見つかっていないことなどから、変性 DNA の増加は nick の増加に由来するものと考えられる。以上の結果は、コールドショックを受けた細胞では DNA に nick の量は多いが、マグネシウムイオンと NAD を添加すると、その量が対照の値にまで減少することを示している。DNA リガーゼはその反応にマグネシウムイオンと NAD を要求し、二本鎖 DNA の一本鎖の nick を連結する酵素である。以上の結果は、コールドショックからの回復に DNA リガーゼ反応が関与することをより直接的に証明したものと考えられる。

## 第十章 放射線感受性及び抵抗性変異株のコールドショックとマグネシウムイオン

大腸菌 B 株には親株に比べて UV や X 線に感受性な変異株  $B_{s-1}$  と抵抗性な変異株  $B/r$  が知られている。そのちがいは DNA 修復機構の強さの差にあり、 $B_{s-1}$  は親株に比べてその機構は弱く、 $B/r$  では強いことが報告されている。この二つの変異株にコールドショックを与え、マグネシウムイオンによる回復効果を生存率で調べた結果、 $B_{s-1}$  の場合にはほとんど回復がみられないが、 $B/r$  の場合には著しい回復を認めた。 $B_{s-1}$  と  $B/r$  のちがいは DNA 修復機構の強弱にあるが、DNA リガーゼ活性が強弱に関係しているかどうか不明であった。本実験で得られた結果は、 $B/r$  株が  $B_{s-1}$  株に比べ強い DNA リガーゼ活性をもつことを支持するものであろう。

## 第十一章 総合論議

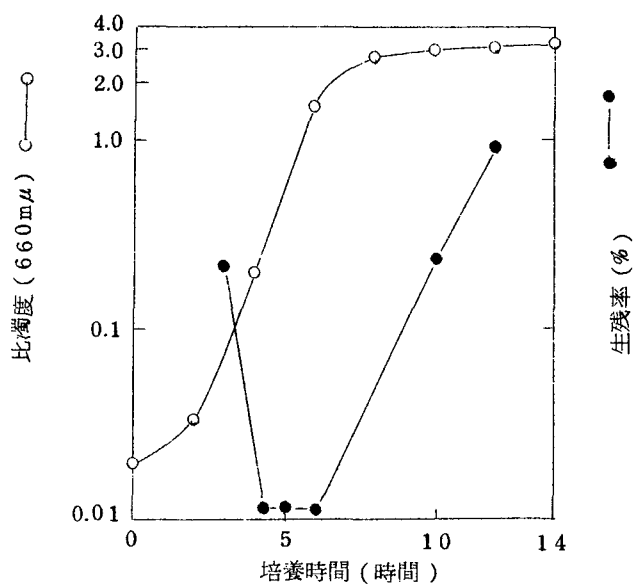
Smeaton らの方法に従ってコールドショックを行なうと、低温 (3℃) に短時間 (2~3 分) 処理するだけで大部分の細胞が集落形成能を失なう。しかし、マグネシウムイオンを添加すると、生存率の著しい増加が起ることが本研究で明らかにされた。このことはコールドショック後、2~3

分間は、大部分の細胞はいわば sublethal な状態にあることを示している。時間の経過と共に不可逆的な死滅に到ると考えられる。

コールドショックからの回復の発見は、第一次的障害の部位を明らかにする上で極めて重要である。2, 4-ジニトロフェノールによる回復の障害の発見に始まり、NADの回復促進効果、コールドショックを受けたDNAが菌体内DNaseにより低分子化されやすい現象などから、回復にはDNAリガーゼ反応が関係するものと推定したが、実際コールドショックした細胞は対照細胞に比べ、熱変性を受けやすいDNAが存在すること、マグネシウムイオン及びNADの共存により回復した細胞のDNAは対照と同程度に熱変性に対して安定であることを示した第九章の実験結果より、ほぼ確実にDNAリガーゼ反応の関与を立証することができた。

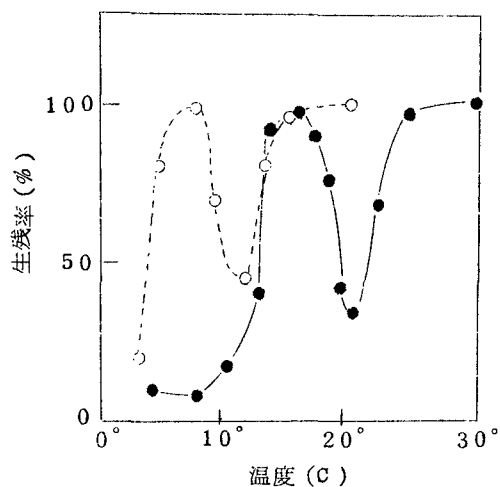
以上の実験結果から、コールドショックによる細胞の第一次的障害機構として、次の二つの可能性が考えられる。第一はコールドショックによる細胞膜の傷害により細胞はマグネシウムイオン及びNADなどを細胞内に保持できなくなり、このためDNAリガーゼが反応せず、その結果DNAの切れ目の結合ができず死滅する可能性である。第二はコールドショックによりDNA上に一本鎖の切れ目が生ずる可能性である。岡崎ら(1968年)により提案された複製点附近におけるDNAの $\theta$ 断片的合成と連結 $\theta$ の仮説などから、以上の二つの可能性を考慮した結果、第一の可能性が第一次的障害機構として妥当であることを述べた。





30℃の培養液を3℃の緩衝液にコールドショックを行ない、生菌数を平板法により測定した。

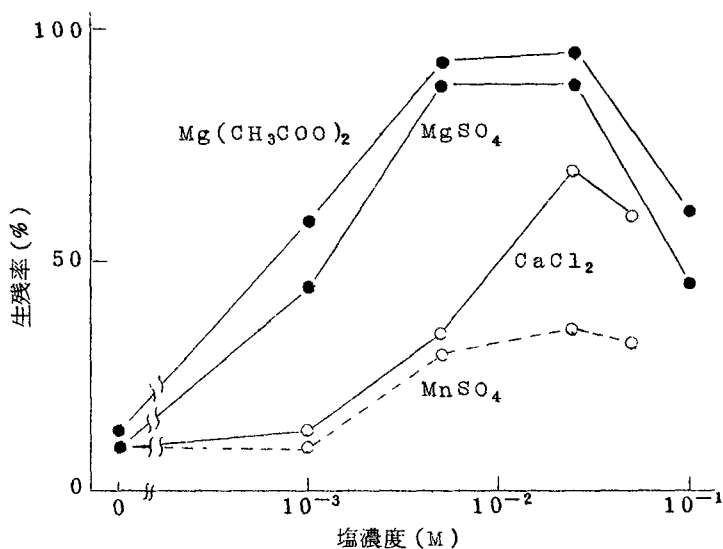
図1 生育時期とコールドショックに対する感受性



各温度の緩衝液にコールドショックを行ない生菌数を平板法により測定した。

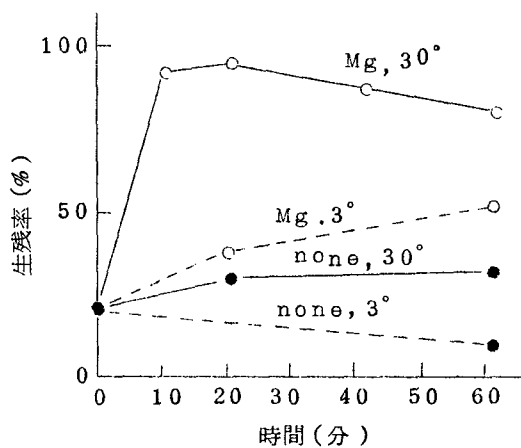
—●— 30℃からコールドショックした場合  
 ---○--- 20℃からコールドショックした場合

図2 コールドショックにおける温度関



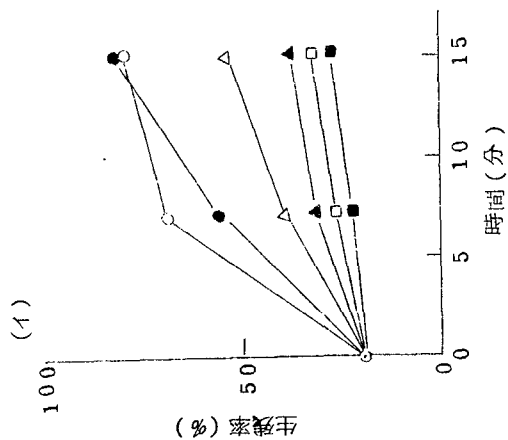
各濃度のそれぞれの塩を含む緩衝液にコールドショックを行なった。

図3 コールドショックによる死滅に及ぼす金属イオンの影響

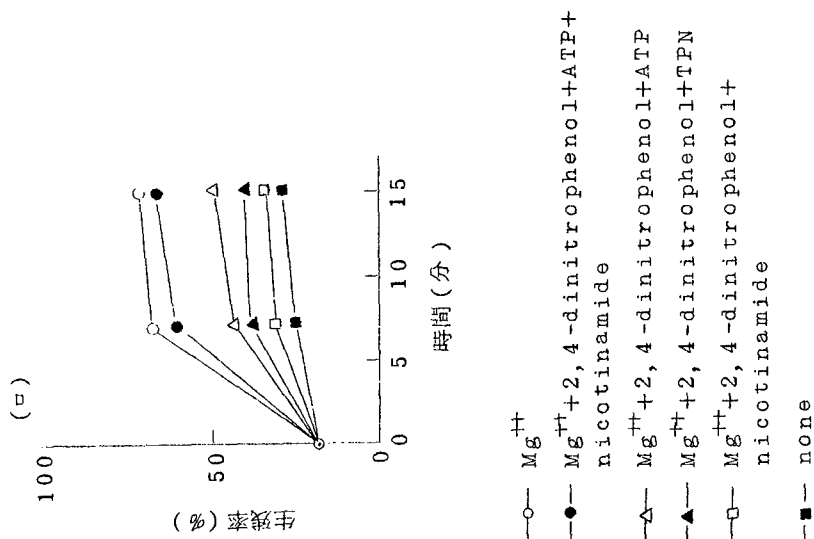


コールドショック後、適当に分割し、 $5 \times 10^{-3}$  の酢酸マグネシウムを添加して、 $30^\circ\text{C}$  或は  $3^\circ\text{C}$  でインキュベートした。その一部をとり、生菌数を平板法により測定した。

図4 回復反応の時間的経過



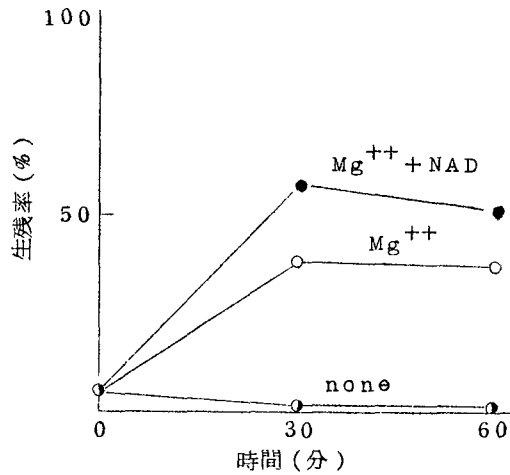
- $Mg^{++}$
- $Mg^{++} + 2, 4\text{-dinitrophenol} + DPN$
- △—  $Mg^{++} + 2, 4\text{-dinitrophenol} + ATP$
- ▲—  $DPN$
- $Mg^{++} + 2, 4\text{-dinitrophenol}$
- none



- $Mg^{++}$
- $Mg^{++} + 2, 4\text{-dinitrophenol} + ATP +$   
nicotinamide
- △—  $Mg^{++} + 2, 4\text{-dinitrophenol} + ATP$
- ▲—  $Mg^{++} + 2, 4\text{-dinitrophenol} + TPN$
- $Mg^{++} + 2, 4\text{-dinitrophenol} +$   
nicotinamide
- none

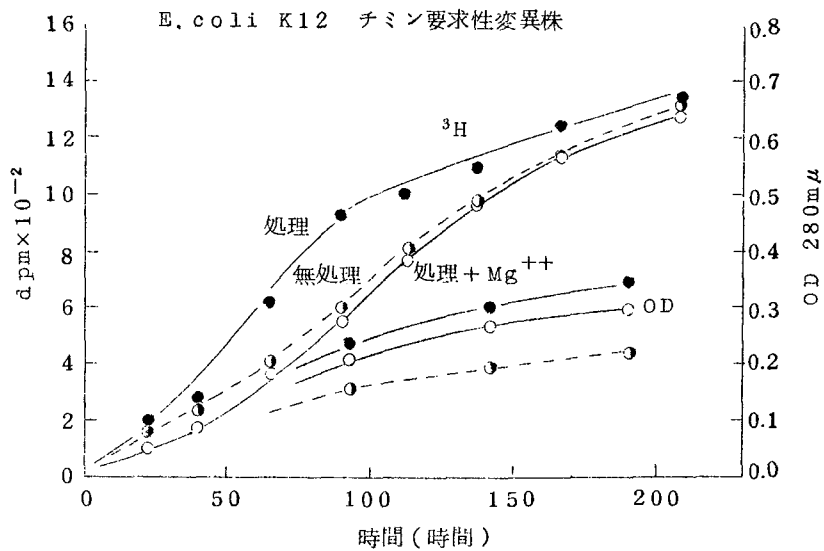
コールドショック後、分割してそれぞれの薬剤を添加し30℃でインキュベートした。

図5 コールドショックからの回復に及ぼす薬剤の影響



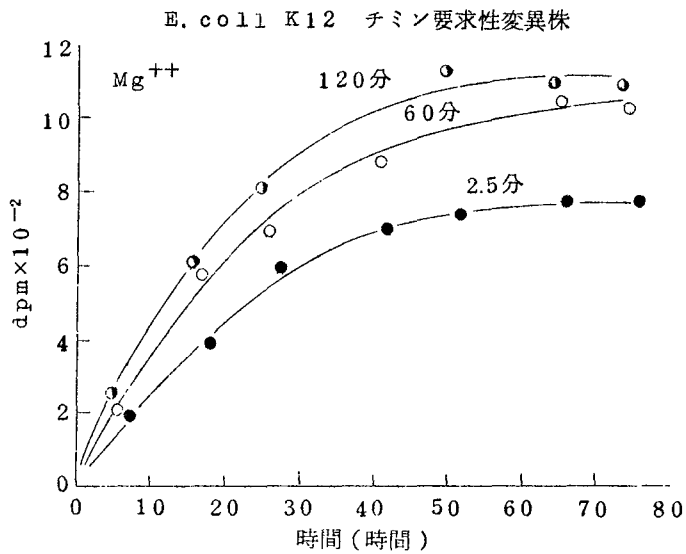
コールドショック後、マグネシウムイオンとNADを添加して3℃でインキュベートした。

図6 コールドショックからの回復に及ぼすNADの効果



<sup>3</sup>H-チミンで標識した細胞にコールドショックを与えた後、一部は直ちに遠心して集菌し(処理細胞)、他はマグネシウムイオンを添加し、30℃で15分間インキュベートしたのも集菌した。コールドショックを行わない細胞を無処理細胞とした。それぞれの細胞をリゾチーム処理後、溶菌液を透析膜に入れ、27℃で透析して、外液へ漏出する放射能を測定した。

図7 コールドショックした細胞より調製した溶菌液におけるDNAの低分子化



$^3\text{H}$ -チミンで標識した細胞をコールドショックし、2.5分、60分及び120分、 $3^\circ\text{C}$ でインキュベート後、マグネシウムイオンを添加して $30^\circ\text{C}$ で15分間インキュベートした。集菌後、リゾチーム処理し、透析膜に入れて、 $37^\circ\text{C}$ で透析して外液へ漏出する放射能を測定した。

図8 コールドショックした後、 $3^\circ\text{C}$ に保った細胞から調製した溶菌液におけるDNAの低分子化

表 1 コールドショックした細胞の DNA の熱変性のうけやすさ

	放射能 (cpm)			
	(I) 全 DNA 量	(II) 上清区分	(III) 吸着区分	(IV) 吸着量 (%)
対 照				
未変性	1714	1588	126	7
熱変性	1746	1424	322	18
コールドショック細胞				
未変性	1796	1407	389	22
熱変性	1800	1081	719	40
Mg <sup>++</sup> 処理細胞				
未変性	750	616	134	18
熱変性	724	509	215	30
Mg <sup>++</sup> +NAD 処理細胞				
未変性	1153	987	166	14
熱変性	1116	856	260	23
NAD 処理細胞				
未変性	1070	835	235	22
熱変性	1144	692	452	40

<sup>3</sup>H-チミンで標識した大腸菌にコールドショックを行ない、2 分間後に、一部に表示した薬剤を添加し、30℃で15分間インキュベートした。コールドショックを行なわない細胞を対照、コールドショック2分後に直ちに遠心集菌した細胞をコールドショック細胞、適当な薬剤を添加したものをそれぞれ処理細胞として表1のように表わした。それぞれの細胞をリゾチーム及びトリプシンで処理して溶菌した。溶菌液に最終濃度 2×SSC になるように塩を添加し、100℃で10分間熱処理後、氷冷下で急冷し、ニトロセルローズ粉末を添加した。遠心後、全 DNA 量の放射能 (I) から上清区分の値 (II) を差し引いて、ニトロセルローズへ吸着した放射能 (III) を計算し、吸着量をパーセント (IV) で表示した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

細菌を急速に冷却すると、細胞の大部分が集落形成能を失って死滅することは古くから知られ、コールドショックとよばれる。各方面の研究者により、この現象が研究されたが、死滅の一次的な原因については従来定説がなかった。本論文は主として大腸菌を用い、きわめて急速な冷却が可能な Smeaton らの方法により、この現象の解明を行ったものである。本論文中重要な成果は、コールドショックにおける2つの温度閾の存在とコールドショックからの回復現象の発見 — その機構の解明である。

著者はまづ対数増殖期の*E. coli*は、7° または17° 程度の急冷により死滅することを発見し、死滅には初発温度により定まる2つの閾値の存在を明かにした。また同様の現象を枯草菌及び *Pseudomonas* 属菌についても認め、その一般性を明かにした。

Mg イオンなどにコールドショックに対する保護作用のあることはすでに知られているが、著者はコールドショックした細胞にMg イオンを添付し加温すると、生残率が著しく増加することを発見した。Mg イオンによる回復効果はショック直後の細胞でいちぢるしいが、次第に効果が減少する。即ち、細胞はショック直後にはsublethal な状態にあるが、時間とともに不可逆的な死滅にいたるものと考えられる。Mg イオンによる回復は、2, 4-ジニトロフェノールにより阻害されるが、さらにNAD の添加により阻害が回復される。この現象から著者はコールドショックからの回復にDNA リガーゼ反応が関係するものと推定した。実際コールドショックを受けた細胞のDNA は菌体内のDNase の作用を受けやすく、またショックされた細胞には熱変性を受けやすいDNA が対照細胞に比べ多量に存在すること、さらにMg イオンとNAD の添加によって回復した細胞のDNA は対照と同程度に熱変性に対し安定であることを認め、ほぼ確実に回復におけるDNA リガーゼの関与を証明した。これらの結果から著者はコールドショックによる死滅の一次的原因を、菌体からのMg イオンの漏出によるDNA リガーゼ活性の低下にあると結論した。

以上のように、本論文はいくつかの新知見を含み、微生物学に貢献する所が大きい。よって三委員とも、著者は農学博士の学位を授与される十分な資格があると判定した。